

# BASE SEQUENCE FOR DETECTING BACTERIA BELONGING TO LACTOBACILLUS AND PEDIOCOCCUS, AND METHOD FOR DETECTING THE SAME BACTERIA

Publication number: JP2002034578

Publication date: 2002-02-05

Inventor: YASUHARA TAKAOMI; TAKAHASHI KYOKO;  
MOTOYAMA YASUAKI

Applicant: ASAHI BREWERIES LTD

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09; C12Q1/68; C12R1/24; C12Q1/68; C12R1/25; C12Q1/68; C12R1/225; C12Q1/68; C12R1/01

- european:

Application number: JP20000230241 20000731

Priority number(s): JP20000230241 20000731

Report a data error here

## Abstract of JP2002034578

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an oligonucleotide capable of preferentially hybridizing to bacteria belonging to Lactobacillus and Pediococcus. SOLUTION: An oligonucleotide complementary to 23S rRNA or rDNA region of bacteria causing turbidity of beer or hybridizing to the region is disclosed. More particularly, an oligonucleotide containing either oligonucleotide having a continuous eight bases in sequence groups represented by the sequence number 1-82 (refer to the specification) and at least 90% homology to the sequence is disclosed. A method for detecting containing a process making a sample suspected of containing a target bacterium contact to at least one kind of a nucleotide fragment is disclosed.

~~~~~  
Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-34578  
(P2002-34578A)

(43) 公開日 平成14年2月5日 (2002.2.5)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I           | テマコード (参考)  |
|---------------------------|-------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 Q 1/68  | A 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 Q 1/68              |       | (C 1 2 Q 1/68 | A 4 B 0 6 3 |
| // (C 1 2 Q 1/68          |       | C 1 2 R 1:24) |             |
| C 1 2 R 1:24)             |       | (C 1 2 Q 1/68 | A           |
| (C 1 2 Q 1/68             |       | C 1 2 R 1:25) |             |

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-230241 (P2000-230241)

(22) 出願日 平成12年7月31日 (2000.7.31)

(71) 出願人 000000055

アサヒビール株式会社  
東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72) 発明者 安原 貴臣

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ  
ヒビール株式会社酒類研究所内

(72) 発明者 高橋 恭子

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ  
ヒビール株式会社酒類研究所内

(74) 代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌検出のための塩基配列、およびそれらの菌の検出  
方法

(57) 【要約】

【課題】 ラクトバチルス属及びペディオコッカス属と優先的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを提供すること。

【解決手段】 ビール混濁菌の23S rRNAまたはrDNAの領域に対して相補的であるか、またはそれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。詳しくは、配列番号1～82に示す配列群中のいずれか8個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相同的であるオリゴヌクレオチド。標的細菌を含んでいる疑いのあるサンプルを少なくとも1種類のヌクレオチド断片と接触させる工程を含む検出方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ラクトバチルス プレビス を選択的に検出するための、ラクトバチルス プレビスの23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号1～14のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項2】ラクトバチルス プレビス及びラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74 を選択的に検出するための、23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号15、16、17のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項3】ラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74 を選択的に検出するための、ラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74の23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号18～31のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項4】ラクトバチルス リンドネリを選択的に検出するための、ラクトバチルス リンドネリの23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号31～48のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項5】ラクトバチルス プランタラムを選択的に検出するための、ラクトバチルス プランタラムの23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号49～64のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項6】ラクトバチルス プランタラム及びペディオコッカス ダムノサスを選択的に検出するための、23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号65のうちの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項7】ペディオコッカス ダムノサスを選択的に検出するための、ペディオコッカス ダムノサスの23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号67～81のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項8】ドレーサーで標識されていることを特徴と

する請求項1～7のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項9】固体支持体上に固定化されていることを特徴とする請求項1～7のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項10】ラクトバチルス属あるいはペディオコッカス属の同定と存在の有無を、少なくとも1種の該細菌の核酸を含むまたは含み得るサンプルにおいて決定する方法であって、該サンプルを少なくとも1個のオリゴヌクレオチドプローブと適当なハイブリダイゼーション条件下に接触させ、次いで、該プローブとサンプルの核酸との間のハイブリダイゼーション複合体の形成または形成がないことを自体公知の方法で決定する方法において、該プローブが請求項1～9のいずれか1項に記載のものから選択されるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする方法。

【請求項11】請求項10に記載の方法において、ラクトバチルス属あるいはペディオコッカス属の定量を、少なくとも1種の該細菌の核酸を含むまたは含み得るサンプルにおいて決定する方法であって、数的に管理した対照細菌を該サンプル中に意図的に混入させ、ここでのハイブリダイゼーション条件下では該プローブと対照細菌の核酸の間にハイブリダイゼーション複合体形成がないが、乳酸菌の核酸の間にハイブリダイゼーション複合体形成があることを特徴とする方法。

【請求項12】請求項1～7のいずれか1項に記載の塩基配列を一部あるいは全部を含むオリゴヌクレオチドをポリメラーゼ存在下での核酸増幅のためのプライマーとして使用する方法。

【請求項13】請求項12に記載の方法で増幅させた核酸を、電気泳動法および核酸染色法により検出する方法。

【請求項14】配列番号82に示される塩基配列の一部または全部を含むラクトバチルス プレビスの23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項15】配列番号83に示される塩基配列の一部または全部を含むラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74の23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項16】配列番号84に示される塩基配列の一部または全部を含むラクトバチルス リンドネリの23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項17】配列番号85に示される塩基配列の一部または全部を含むラクトバチルス プランタラムの23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項18】配列番号86に示される塩基配列の一部または全部を含むペディオコッカス ダムノサス ABBC no.74の23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、ラクトバチルス

(Lactobacillus) 属菌及びペディオコッカス (Pediococcus) 属菌の23S rRNAの遺伝子配列及びその配列を用いた該菌の検出、または該菌の同定、または該菌の定量に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】近年のビール生(なま)化への流れは、ビール鮮度という新たな価値観をもたらした。こうした背景から、ビール製造会社にとっては、製品製造から出荷までの時間を劇的に短縮するとともに、ビール混濁菌の汚染を迅速に正確に判定する必要性が高まっている。ビール混濁を引き起こす細菌の代表的なものの1つが通性嫌気性菌である乳酸菌である。

【0003】従って、食品業界特にビール業界において使用できる、乳酸菌の迅速かつ選択的な検出を可能とするのに十分特異的で感度の高い細菌診断試験法を開発することは重要である。古典的なビール混濁細菌の同定は、形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験などの多くの性状ならびに生化学的試験を行い、最終的に新鮮なビールに単離した細菌を再摂取し、その増殖能の観察を行うことにより決定した。これらの一連の操作は、多くの時間と労力を要すると同時に正確な判定も困難な場合が多かった。また最近では、乳酸菌から核酸を抽出して特定のオリゴヌクレオチドをプライマーあるいはプローブとしてPCR (Polymerase Chain Reaction) (特開平10-210980, 特開平6-141899, 特開平6-113888) あるいはハイブリダイゼーション (特表平8-503620) を行う方法がある。しかし、これらの方法は菌体からの核酸の抽出工程を必要とするうえ、個々の菌体を検出することはできない。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の1つの目的は、ビール混濁の原因となる生物のリボソームRNA (rRNA) およびリボソームDNA (rDNA) 中の独特の核酸配列、及びそれに相補的なオリゴヌクレオチドを提供するものである。本発明の別の目的は、特異性、感度および速度を併有する核酸ハイブリダイゼーション下においてアクセス可能とされ得るrRNA及びrDNAの標的領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを提供することである。本発明の別の目的は更に、適当なトレーサーで標識したこれらのオリゴヌクレオチドをプローブとして機能させて、ハイブリダイゼーションを行い、当該細菌個体を選択的に検出同定ならびに定量する方法を提供することである。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】これら目的を達成するための本発明は、ラクトバチルス属菌およびペディオコッカス属菌の23S rRNAをコードする遺伝子の核酸配列である。また、本発明は、ラクトバチルス属菌およびペディオコッカス属菌を選択的に検出するための、該菌の23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配

列番号にあるいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチドである。また本発明は、ラクトバチルス属あるいはペディオコッカス属の同定と存在の有無を、少なくとも1種の該細菌の核酸を含むまたは含み得るサンプルにおいて決定する方法において、前記オリゴヌクレオチドのいずれかをプローブとして用いることを特徴とする。

【0006】さらに本発明は、前記ヌクレオチドをポリメラーゼ存在下での核酸増幅のためのプライマーとして使用する方法である。細菌リボソームは5S、16Sおよび23S rRNAと呼ぶ少なくとも3種類のRNA分子を含む。歴史的にこれらの名前は、沈降速度で決定されるRNA分子の大きさに関係している。本発明において、細菌のリボソームrRNAは、標的として使用できる。これを使用する利点の一つは、rRNAが生きている細胞全てに豊富に存在するという点である。

【0007】本発明をより詳細に開示する前に、本明細書で使用する種々の用語を下記のように定義する。「オリゴヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド断片」は天然の(または所望により修飾された)核酸の情報配列によって特徴づけられ、かつ天然の核酸と同様に、予め定めた条件下で、相補的または実質的に相補的なヌクレオチド断片とハイブリダイズ可能であるヌクレオチド単位の鎖を示す二つの同義用語である。その鎖は天然の核酸とは異なる構造のヌクレオチド単位を含みうる。例えば、オリゴヌクレオチドの構成単位である核酸が天然に存在する核酸に見られるホスホジエステル結合でなく、他のエステル結合、またはアミド結合(一般にPNAと呼ばれる)で結合したものであって、標的領域にハイブリダイズできるものであればよい。オリゴヌクレオチド(または、ヌクレオチド断片)は、例えば、100までのヌクレオチド単位を含みうる。一般には、少なくとも8個のヌクレオチド単位を含み、天然の核酸分子から、または遺伝子組換えによって、または化学合成によって得ることができる。

【0008】「ハイブリダイゼーション」は、適切な条件下で、十分に相補的な配列を有するヌクレオチド断片同士が、安定かつ特異的な水素結合によって結合して二本鎖を形成することと理解される。ハイブリダイゼーションの条件は、「ストリンジエンシー」すなわち反応条件の厳しさによって決定される。ハイブリダイゼーションを行うときのストリンジエンシーが高いほど、特異性は高い。つまり、適切なハイブリダイゼーション条件とは、特にプローブ/標的二本鎖核酸の塩基組成、ならびに両者の核酸配列の間の不一致度から決定され、ハイブリダイゼーション溶液に存在するイオン種の濃度および種類、変性剤の性質および濃度、またはハイブリダイゼーション温度などのハイブリダイゼーション反応パラメーターの関数として表現される。ハイブリダイゼーシ

ン反応を行うときの条件のストリンジェンシーは、特に、使用するプローブに依存する。これら全てのデータは周知であり、適切な条件は、通常の技術者の能力の範囲内において、ルーチン実験により各ケースで決定され得る。

【0009】また、「相同である」とは、2個またはそれ以上の核酸配列間の類似の度合いを表すことを意味し、生物間の分類学的な類似度合いを意味するものではない。類似の度合いはパーセンテージで表し、例えば2個の配列間が90%相同であるとは、第1の配列の塩基の90%が第2の配列の塩基と同一にマッチすることを意味する。「プローブ」は、決められた条件下でハイブリダイゼーション特異性を有して、本発明の場合は、rRNA、またはrDNAに含まれるヌクレオチド配列を有する標的核酸とハイブリダイゼーション複合体を形成する、例えば、5～100個のヌクレオチド単位、特に8～35個のヌクレオチド単位を含むヌクレオチド断片である。プローブは、検出、同定、定量目的に使用することができる。例えば、放射性同位体、酵素、特に、色素原性、蛍光性または発光性基質に作用し得る酵素（特に、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、色素産生化合物、色素原性、蛍光性もしくは発光性化合物、ヌクレオチド塩基の類似体およびビオチンなどのリガンドから選択されるマーカーによって標識できる。

【0010】「プライマー」は、例えば8～100ヌクレオチド単位を含み、かつ例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）などの増幅法、配列決定プロセス、逆転写法などにおける酵素的重合の開始のための決められた条件下でハイブリダイゼーション特異性を有するオリゴヌクレオチドである。本発明に係るオリゴヌクレオチドは、サンプル中の標的核酸の有無の試験において、公知の全てのハイブリダイゼーション技術、特に「ドットプロット」と呼ばれるフィルター上での点付着の技術（MANIATISら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982）、「サザンプロット」と呼ばれるDNA分離転写の技術（SOUTHERN E.M., Mol. Biol., 98, 503(1975)）、「ノーザンプロット」と呼ばれるRNA分離転写の技術に従って使用することができる。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】本発明によれば、ラクトバチルス属及びペディオコッカス属と優先的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが提供される。本発明のオリゴヌクレオチドは、ビールの混濁の原因となる生物の存在を検出するために有用である。本発明の1つは、ビール混濁菌の23S rRNAまたはrDNAの領域に対して相補的であるか、またはそれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドについてである。詳しくは、配列番号1～81に示す配列群中のいずれか8個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相補的であるオリゴヌクレオチドである。本発明のもう一つは、ラクトバチ

ルス属菌及びペディオコッカス属菌の23S rRNAの遺伝子配列であり、詳しくは配列番号82～86のDNA配列である。

【0012】さらに本発明のもう一つは、ビール混濁菌の存在を検出するための方法である。この方法は、標的細菌を含んでいる疑いのあるサンプルを少なくとも1種類のヌクレオチド断片と接触させる工程を含む。このヌクレオチド断片は、ビール混濁の原因となる乳酸菌のrRNAまたはrDNAと優先的にハイブリダイズする約8～100塩基を含む。この方法は、ヌクレオチドプローブが標的rRNAまたはrDNAと優先的に結合して複合体を形成するようにハイブリダイゼーション条件を試料に付与し、そして標的生物（1または2以上）の存在を指示するものとして複合体を検出する工程を含む。好ましくは、本ヌクレオチドプローブは配列番号1～81に示す配列群から選択される配列中のいずれか8個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相補的である。本発明のヌクレオチド断片は、ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料中のビール混濁生物の特異的検出のためのハイブリダイゼーションアッセイ開発の基礎を提供する。本発明ヌクレオチド断片はまた、ビール混濁菌の存在を確認するための基礎を提供する。

【0013】本発明のプローブの開発に際して最初にとられたステップは特異的核酸プローブに対して、標的とするビール混濁菌の23S rRNA内の特有な領域を同定することであった。これは、23S rRNA内のどの標的領域が、ビール混濁の原因となるラクトバチルス属およびペディオコッカス属に対して特異的であるかを見いだすことであった。そこで、これらの実現のためラクトバチルス プレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス スピーズ ABBC no.74 (*Lactobacillus species* ABBC no.74)、ラクトバチルス リンドネリ (*Lactobacillus lindneri*)、ラクトバチルス プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ペディオコッカス ダムノサス (*Pedococcus damnosus*) の23S rRNAの配列（配列番号82～86）を公知の実験プロトコールにより決定し、他の細菌の23S rRNAの配列と比較した。この結果を基に、上記ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌に対して特異的なプローブを配列番号1～81のごとく設計した。

【0014】具体的には、（1）ラクトバチルス プレビスに特異的なプローブが配列番号1～14であり、（2）ラクトバチルス プレビス およびラクトバチルス スピーズ ABBC no.74に特異的なプローブが配列番号15～17であり、（3）ラクトバチルス スピーズ ABBC no.74に特異的なプローブが配列番号18～31であり（4）ラクトバチルス リンドネリに特異的なプローブが配列番号32～48であり、（5）ラクトバチルス プランタラムに特異的なプローブが配列番号49～64であり、（6）ラクトバチルス プランタラムおよびペディオコ

ツカス ダムノサスに特異的なプローブが配列番号65であり、(7) ペディオコッカス ダムノサスに特異的なプローブが配列番号66~81である。

【0015】本発明のプローブはfluorescence in situ hybridization (以下FISHと略す) に用いることができる。すなわち、ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料を、遠心分離またはビール混濁細菌を捕捉可能なメンブレンフィルターで処理し、試料中に存在するかもしれない標的ビール混濁菌と検出プローブとを適切なハイブリダイゼーション条件下で接触させる。検出プローブは標的細菌内の細胞質内に侵入し、そこに存在する23S rRNA内の標的部位に適切なハイブリダイゼーション条件下でアクセスし、ハイブリダイズする。この際に、検出プローブを、放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質等のトレーサー標識をすることで特異的なハイブリダイゼーションの現象を適当な手法によってモニタリングすることができる。たとえば、検出プローブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィー等の方法によってアッセイを実施し、蛍光物質で標識されている場合には蛍光顕微鏡やレーザースキャニング技術を用いてアッセイを実施し、化学発光物質で標識されている場合には感光フィルムを用いた解析やCCDカメラを用いたデジタル解析を実施し、標的生物の存在の有無を判定することができる。

【0016】また、上記で定義したオリゴヌクレオチドは公知の方法で耐熱性ポリメラーゼの存在下、ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の23S rDNAもしくは23SrRNAを増幅合成するための特異的なプライマーとして使用することができる(PCR、RT-PCRなど)。使用するプライマーの組み合わせと適切な反応プログラムの設定により、目的とする核酸が増幅されるかどうかの結果から標的細菌の存在の有無もまた判定可能である。

#### 【0017】

【実施例】本発明を下記実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 FISH法によるビール混濁細菌の検出・同定  
ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料からの細菌の捕集は以下の2つの手法を用いて行った。

#### 【0018】(1) 遠心分離法による捕集

供試サンプル50 mlを遠心チューブに入れ、遠心分離(10,000×g、10分間、4℃)を行い、上清液を捨て細菌ペレットを回収後、さらに30 mlのPBS溶液で懸濁し同条件で遠心分離し洗浄を行った。洗浄後、細菌ペレットを1 mlの固定液(50%エタノールを含むPBS)に再懸濁した。これらの細菌液をゼラチンでコーティングしたスライドガラス上に一滴のせ風乾後、50%エタノール液、80%

エタノール液、続いて99%エタノール液中にそれぞれ2分間静置して脱水処理を行い、FISHに供する試験標本とした。FISHに用いるプローブは、5' 端をFITC標識した蛍光プローブを使用した。FISHは、50 pmolの蛍光プローブを含むハイブリダイゼーション液(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6) 20 µlを上述した試験標本に接触させ、高湿度を保ったチャンバー内で44℃、1時間行った。洗浄は、以下の通り行った。46℃の上述したハイブリダイゼーション液中に20分間、試験標本を静置後、常温の滅菌蒸留水ですすぎ、余分な蛍光プローブを除去した。このハイブリダイゼーションと洗浄を終えた試験標本を風乾後、褪色防止剤(ProLong(登録商標); Molecular Probe社)を滴下して蛍光顕微鏡で観察した。

【0019】(2) メンブレンフィルターによる捕集  
供試サンプル50 mlをポリカーボネート製のメンブレンフィルター(直径47 mm、孔径0.4 µm)で吸引濾過した後、50 mlのPBSで2回洗浄した。続いて10 mlのハイブリダイゼーションバッファー(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6)で洗浄し、FISHに供した。FISHは、50 pmolの蛍光プローブを含むハイブリダイゼーション液(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6) 200 µlをプラスチックシャーレに滴下し、この上に菌体の捕捉されている面が上になるようにフィルターを接触させ、高湿度を保ったチャンバー内で44℃、1時間行った。洗浄は、以下の通り行った。ハイブリダイゼーションの終わったフィルターを吸引濾過装置にセットし、46℃のハイブリダイゼーションバッファー100 ml、続いて常温のフィルター濾過した滅菌水50 mlを用いて吸引洗浄した。ハイブリダイゼーションと洗浄を終えたメンブレンフィルターを無菌的に風乾後、無蛍光スライドガラス上に細菌捕捉面を上にしてのせ、褪色防止剤(ProLong(登録商標); Molecular Probe社)を滴下し、カバーガラスでフィルターを覆い蛍光顕微鏡で観察した。観察画像を図1に示す。

【0020】FITC標識した特異的なプローブを用いてFISH解析を行い、蛍光顕微鏡下で観察するとターゲットとなる菌全体が蛍光を発しているのが見える。例えば、FITC標識した配列番号1の相補鎖プローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行うと、図1に示すようにラクトバチルス プレビスは蛍光標識されて検出されるが、大腸菌等は検出されない。上述した2つの手法の結果は完全に一致し、FISH法でのプローブの特異性は表1および表2に示す通りであった。

#### 【0021】

【表1】

| 配列番号 | L. brevis ABBC74<br>JCM1059 | L. lindneri<br>DSM20690 | L. plantarum<br>JCM1149 | P. damnosus<br>JCM5886 | B. subtilis<br>DSM347 | B. cereus<br>IAM1656 | E. coli<br>K-12 |
|------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 1    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 2    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 3    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 4    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 5    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 6    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 7    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 8    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 9    | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 10   | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 11   | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 12   | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 13   | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 14   | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 15   | ○                           | x                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 16   | ○                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 17   | ○                           | ○                       | x                       | △                      | x                     | x                    | x               |
| 18   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 19   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 20   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 21   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 22   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 23   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 24   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 25   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 26   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 27   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 28   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 29   | x                           | ○                       | x                       | △                      | x                     | x                    | x               |
| 30   | x                           | ○                       | x                       | △                      | x                     | x                    | x               |
| 31   | x                           | ○                       | x                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 32   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 33   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 34   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 35   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 36   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 37   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 38   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 39   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 40   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 41   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 42   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 43   | x                           | x                       | ○                       | x                      | △                     | x                    | x               |
| 44   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 45   | x                           | x                       | ○                       | x                      | △                     | x                    | x               |
| 46   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 47   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 48   | x                           | x                       | ○                       | x                      | x                     | x                    | x               |
| 49   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 50   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 51   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 52   | x                           | x                       | ○                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 53   | x                           | x                       | ○                       | ○                      | x                     | x                    | x               |

【0022】

【表2】

| 配列番号 | L. brevis ABBC74<br>JCM1059 | L. lindneri<br>DSM20690 | L. plantarum<br>JCM1149 | P. damnosus<br>JCM5886 | B. subtilis<br>DSM347 | B. cereus<br>IAM1656 | E. coli<br>K-12 |
|------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 54   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 55   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 56   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 57   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 58   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 59   | x                           | x                       | x                       | ○                      | △                     | x                    | x               |
| 60   | x                           | △                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 61   | x                           | △                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 62   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 63   | x                           | x                       | x                       | ○                      | △                     | x                    | x               |
| 64   | △                           | △                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 65   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 66   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 67   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 68   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 69   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 70   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 71   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 72   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 73   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 74   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 75   | x                           | x                       | △                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 76   | x                           | x                       | △                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 77   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 78   | x                           | x                       | △                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 79   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 80   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |
| 81   | x                           | x                       | x                       | ○                      | x                     | x                    | x               |

【0023】また、複数のプローブを同時に用いる手法もある。例えば、プローブ1とプローブ2を同時にFISH解析に供試すると、プローブ1とプローブ2はそれぞれ23S rRNA内の標的領域が異なるため、加算的にシグナルの増強ができた。このように、本発明によって得たプローブを検出したい標的標に依じて、組み合わせて用いることは有用であった。

【0024】実施例2 FISH法によるラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の定量  
試料中のラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の定量は下記の通り行った。実施例1のごとく試料中の細菌を捕集する直前に、バクトメーターを用いて直接計数管理した対照細菌を試料中に添加し、FISH解析結果を分析することにより得た。例えば、ラクトバチルス プレビスに汚染されたビールに対し、直接計数法によって管理した大腸菌(C個)を混入させ、ラクトバチルス プレビスの23S rRNAに特異的な配列番号3に示す蛍光標識プローブを用いて実施例1のごとくFISH解析を行った後、10 µg/mlのDAPIを含む褪色防止剤(ProLong(登録商標); Molecular Probe社)を用いて全細菌を染色した。得られる蛍光画像から、図2のごとくDAPIに染まった菌数(A)とFITC標識された菌数(B)を決定し、ビール中に存在したラクトバチルス プレビスの数を推定できる。すなわち、試験に供したビール中に存在したラクトバチルス プレビス数(N)は以下の関係式で表すことができる。

$$【0025】N = B \times C / (A - B)$$

蛍光顕微鏡観察により、蛍光を発しない細胞と発する細胞の比率からラクトバチルス属及びペディオコッカス属を定量できる。例えば、ラクトバチルス プレビス単独に汚染された試料に10<sup>7</sup>個の大腸菌を添加して回収した検体に対し、蛍光標識した配列番号3の相補鎖プローブを用いてFISH解析を行った場合、蛍光標識されない大腸菌1000個に対し、蛍光標識された細胞(ラクトバチルス brevis)が10個認められると、ラクトバチルス プレビスはもとの試料中に10<sup>5</sup>個存在したことになる。

【0026】実施例3 ドットプロットによるラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の同定  
市販品として入手可能なニトロセルロース、ナイロン、PVDF等のフィルター上に細菌試料から公知の手法により抽出した核酸を固定化した。目的に応じて、プローブはロシュ・ダイアグノスティックス社のDIGオリゴヌクレオチドテイルングキットを用いて標識し、ハイブリダイゼーションに供した。検出は、ロシュ・ダイアグノスティックス社のDIG発光検出キットを用い、その手順書に従って行い、最終的にフィルターを適当な時間X線フィルムに露光し、ハイブリダイゼーションシグナルの有無から、ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の同定を行った。ドットプロットの結果を表3および表4に示す。

【0027】

【表3】



| 配列番号 | L. brevis ABBC74<br>JCM1059 | L. lindneri<br>DSM20690 | L. plantarum<br>JCM1149 | P. damnosus<br>JCM5886 | B. subtilis<br>DSM347 | B. cereus<br>IAM1656 | E. coli<br>K-12 |
|------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 1    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 2    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 3    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 4    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 5    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 6    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 7    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 8    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 9    | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 10   | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 11   | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 12   | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 13   | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 14   | ○                           | ×                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 15   | ○                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 16   | ○                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 17   | ○                           | ○                       | △                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 18   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 19   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 20   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 21   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 22   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 23   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 24   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 25   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 26   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 27   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 28   | ×                           | ○                       | △                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 29   | ×                           | ○                       | △                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 30   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 31   | ×                           | ○                       | ×                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 32   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 33   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 34   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 35   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 36   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 37   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 38   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 39   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 40   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 41   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 42   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 43   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | △                     | ×                    | ×               |
| 44   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | △                     | ×                    | ×               |
| 45   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 46   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 47   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 48   | ×                           | ×                       | ○                       | ×                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 49   | ×                           | ×                       | ×                       | ○                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 50   | ×                           | ×                       | ×                       | ○                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 51   | ×                           | ×                       | ×                       | ○                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 52   | ×                           | ×                       | ×                       | ○                      | ×                     | ×                    | ×               |
| 53   | ×                           | ×                       | ×                       | ○                      | ×                     | ×                    | ×               |

【0028】

【表4】

| 配列番号 | L. brevis ABBC74 | L. lindneri | L. plantarum | P. damnosus | B. subtilis | B. cereus | E. coli |
|------|------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-----------|---------|
|      | JCM1059          | DSM20690    | JCM1149      | JCM5886     | DSM347      | IAM1656   | K-12    |
| 54   | x                | x           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 55   | x                | x           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 56   | x                | x           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 57   | x                | x           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 58   | x                | x           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 59   | x                | x           | x            | ○           | △           | x         | x       |
| 60   | x                | △           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 61   | x                | △           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 62   | x                | x           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 63   | x                | x           | x            | ○           | △           | x         | x       |
| 64   | △                | △           | x            | ○           | x           | x         | x       |
| 65   | x                | x           | x            | ○           | ○           | x         | x       |
| 66   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 67   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 68   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 69   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 70   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 71   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 72   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 73   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 74   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 75   | x                | x           | △            | x           | ○           | x         | x       |
| 76   | x                | x           | △            | △           | ○           | x         | x       |
| 77   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 78   | x                | x           | △            | x           | ○           | x         | x       |
| 79   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |
| 80   | x                | x           | x            | △           | ○           | x         | x       |
| 81   | x                | x           | x            | x           | ○           | x         | x       |

【0029】

【配列表】

&lt;110&gt; Asahi Breweries Ltd.

&lt;120&gt; Nucleotide sequences for detecting Lactobacillus and Pediococcus bacteria and the method for detecting these bacteria.

&lt;130&gt; 2000-25P

&lt;160&gt; 82

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 1

tcaagttgta atcatcgta aagatgatt

29

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 2

tctgcctcaa cttgactatg

20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 3

gggggtatca ccctctatgc cgagccttcc cagac

35

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 4

17

18

ctccggtctt tccaccttaa

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 5

tctacatcaa ttactgaaa

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 6

aacacacatt tccaatcgtg tgacacacat agcctc

36

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 7

tgtccttagc gataagcatt tgactcatca cca

33

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 8

attcggtcct cgtcacgcct

20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 9

cttcggttat catcaacttt g

21

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 10

ctgagggttg acgatttcac c

21

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 11

ccttgcaaat taacgtaact

20

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus brevis

&lt;400&gt; 12

atcactcgac cttacggtcg aat

23

&lt;210&gt; 13

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus brevis  
 <400> 13  
 aagtcctttgc gatcttgctt cggt 24  
 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus brevis  
 <400> 14  
 cgttcaaaca tgattaacta gta 23  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus brevis, Lactobacillus species ABBC no.74  
 <400> 15  
 tgcggctgca cttgcgtgca 20  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus brevis, Lactobacillus species ABBC no.74  
 <400> 16  
 cggatataaa tctgtggcat 20  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus brevis, Lactobacillus species ABBC no.74  
 <400> 17  
 ggcttcattt ctgggcttcg 20  
 <210> 18  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74  
 <400> 18  
 ctaagcaata accatcggtt aagatggct 29  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74  
 <400> 19  
 tctgccttta cttagctatg 20  
 <210> 20  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74  
 <400> 20  
 ggggctatca ccctctttgg ccaggcttcc caacc 35  
 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> DNA

21

22

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 21

ctccgtcttt tcaacttaac

20

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 22

tctacaccaa cataactgaaa

20

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 23

aacgcacatt tccaatcgtg cgcacggctt agcctc

36

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 24

aaccggctg ccagcattta actggttaacc t

31

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 25

tgcggctgca cttgcgtgca

20

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 26

cttcggttac caacaacttt g

21

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 27

ctgagggtta ttggtttcgt t

21

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 28

ccttgcatgt tagcgtaact

20

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus species ABBC no.74

&lt;400&gt; 29

|                                         |    |  |
|-----------------------------------------|----|--|
| 23                                      |    |  |
| atcacgtgac ctaatggtca cat               | 23 |  |
| <210> 30                                |    |  |
| <211> 24                                |    |  |
| <212> DNA                               |    |  |
| <213> Lactobacillus species ABBC no.74  |    |  |
| <400> 30                                |    |  |
| tagtccttac gatctagctt cacc              | 24 |  |
| <210> 31                                |    |  |
| <211> 23                                |    |  |
| <212> DNA                               |    |  |
| <213> Lactobacillus species ABBC no.74  |    |  |
| <400> 31                                |    |  |
| cgttcaaaca cactttacta gta               | 23 |  |
| <210> 32                                |    |  |
| <211> 29                                |    |  |
| <212> DNA                               |    |  |
| <213> Lactobacillus lindneri            |    |  |
| <400> 32                                |    |  |
| ctacgcagtg accagtcag acactgggc          | 29 |  |
| <210> 33                                |    |  |
| <211> 20                                |    |  |
| <212> DNA                               |    |  |
| <213> Lactobacillus lindneri            |    |  |
| <400> 33                                |    |  |
| tctgcctctg cgcagctag                    | 20 |  |
| <210> 34                                |    |  |
| <211> 32                                |    |  |
| <212> DNA                               |    |  |
| <213> Lactobacillus lindneri            |    |  |
| <400> 34                                |    |  |
| gagactatca ctctttggtg cagcttccca gc     | 32 |  |
| <210> 35                                |    |  |
| <211> 20                                |    |  |
| <212> DNA                               |    |  |
| <213> Lactobacillus lindneri            |    |  |
| <400> 35                                |    |  |
| ctccgctttt tcggcttaac                   | 20 |  |
| <210> 36                                |    |  |
| <211> 20                                |    |  |
| <212> DNA                               |    |  |
| <213> Lactobacillus lindneri            |    |  |
| <400> 36                                |    |  |
| tctacggcaa cataactaaa                   | 20 |  |
| <210> 37                                |    |  |
| <211> 36                                |    |  |
| <212> DNA                               |    |  |
| <213> Lactobacillus lindneri            |    |  |
| <400> 37                                |    |  |
| aacatacatt tccatcagta tgcataactt agcctt | 36 |  |
| <210> 38                                |    |  |

25

26

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus lindneri  
 <400> 38  
 aaccagggtta caagcattta 20  
 <210> 39  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus lindneri  
 <400> 39  
 tgcggctggc cgtgaggcca 20  
 <210> 40  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus lindneri  
 <400> 40  
 gttcaatta tcaaatactt tt 22  
 <210> 41  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus lindneri  
 <400> 41  
 ctgagggtat tcgatttcat t 21  
 <210> 42  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus lindneri  
 <400> 42  
 ccttgcatgc aactgtaact 20  
 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus lindneri  
 <400> 43  
 cggacataaa tcagtggat 20  
 <210> 44  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus lindneri  
 <400> 44  
 atcacgcaac gtagttgcgt 20  
 <210> 45  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus lindneri  
 <400> 45  
 agtccttgcg gtctgccttc att 23  
 <210> 46  
 <211> 23  
 <212> DNA

27

28

&lt;213&gt; Lactobacillus lindneri

&lt;400&gt; 46

tggtcaaaca taattaacta gta

23

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus lindneri

&lt;400&gt; 47

ttttcgatcc tcatcatcgc ttgcc

25

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus lindneri

&lt;400&gt; 48

ggcttcattt cgaggctttg

20

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 49

tctagtggta acagttgatt aaaactgct

29

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 50

tttacctcca actagactat g

21

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 51

ctatcaccat ctatggcgga ttttccaaa

30

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 52

ctccgacttt ttagtcttaa

20

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 53

tctataacct cgtactcaaa a

21

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 54



29

30

gacattctaa tccaacagaa tgcacatctt agcctc

36

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 55

taaagtgaag agcatttgac

20

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 56

ccttcgacta tcaagttctt tg

22

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 57

ctgagagaat ttgatttaac c

21

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 58

ccttcgacgg gatcataact

20

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 59

cggatatgaa tcaatggcat

20

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 60

atcacgcgac ctaatggctc cat

23

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 61

aagtcctcac gatcttgctt cacc

24

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus plantarum

&lt;400&gt; 62

tgctcaaacg cacttactag ta

22

&lt;210&gt; 63

31

32

<211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus plantarum  
 <400> 63  
 tttcgtccc cgtcacagct tgcct 26  
 <210> 64  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus plantarum  
 <400> 64  
 ggcttcaatt ctgagcttcg 20  
 <210> 65  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus plantarum , Pediococcus damnosus  
 <400> 65  
 tgcggctgat ctgcatca 20  
 <210> 66  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Pediococcus damnosus  
 <400> 66  
 cgtggcggtta acaacggatt aatgttgtt 29  
 <210> 67  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Pediococcus damnosus  
 <400> 67  
 tctacctcca accacgttat g 21  
 <210> 68  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Pediococcus damnosus  
 <400> 68  
 ggggctgtcc ccgtctggc cagtcttc 28  
 <210> 69  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Pediococcus damnosus  
 <400> 69  
 gctccgtttc ttcaacttaa 20  
 <210> 70  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Pediococcus damnosus  
 <400> 70  
 tctacatctg catactcagt 20  
 <210> 71  
 <211> 35  
 <212> DNA

<213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 71  
 ggacattat ccaactgtgt gcttttctta gcctc 35  
 <210> 72  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 72  
 gaaaagataa agcatttac 20  
 <210> 73  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 73  
 gttcggctat gaaaatcttt g 21  
 <210> 74  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 74  
 ctgagggatt ttcattttgc c 21  
 <210> 75  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 75  
 cctggcatgc aaacgtaact 20  
 <210> 76  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 76  
 cggacataaa tcaatggcat 20  
 <210> 77  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 77  
 atcacgccac cttacggtgg cat 23  
 <210> 78  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 78  
 agtcctcag gtctgccttc atc 23  
 <210> 79  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> *Pediococcus damnosus*  
 <400> 79

35

36

tgttcaaaca agtttaacta gta

23

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

<213> *Pediococcus damnosus*

&lt;400&gt; 80

tttcgctccc catcacaact tgcctt

26

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

<213> *Pediococcus damnosus*

&lt;400&gt; 81

ggcttcattc caaagcttcg

20

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 2741

&lt;212&gt; DNA

<213> *Lactobacillus brevis*

&lt;400&gt; 82

ggcttctagg agccgatgaa ggacgggact aacaccgata tgcttcgggg agctgtacgt 60  
 aagctttgat cggagattt ccaaatgggg aaaccaatc atctttaccg atgattacaa 120  
 cttgatgaat acatagtcaa gttgaggcag acgtggggaa ctgaaacatc taagtaccca 180  
 caggaaagaga aagaaaaatc gattccctaa gtagcggcga gcgaacgggg aacagcccaa 240  
 accaggaagc ttgctttctg gggttgtagg actgaacatt tgagttacca aagttgatga 300  
 taaccgaaga gtctgggaag gctcggcata gagggtgata ccccgtagg tgaatcgtc 360  
 aaccctcagt tcaggatcct gagtacggcc acacacgtga aacgtggtcg gaatccggga 420  
 ggaccatctc ccaaggctaa atactcccta gtgaccgata gtgaaccagt accgtgaggg 480  
 aaagtgaaa agcaccgcgg aagcggagtg aaatagttcc tgaaaccatg tgcttacaat 540  
 tagtttaggc ccgttaatgg gtgatagcgt gccttttgta gaatgaaccg gcgagttacg 600  
 ttaatttgca aggttaaggt ggaaagaccg gagccgtagc gaaagcgagt ctgaaacggg 660  
 cgtttcagta aattgatgta gacccgaaac caggtgacct acccatgtcc aggttgaagg 720  
 tgcggtaaaa cgactggag gaccgaaccc gtgtatgttg aaaaatgctg ggatgaggtg 780  
 tgggtagcgg tgaattcca aacgaacttg gagatagctg gttctctccg aaatagcttt 840  
 agggttagcc tcggagttaa gaatcgtgga ggtagagcca ctgtttggac taggggcccg 900  
 tcatgggtta ctgaattcag ataaactccg aatgccacag atttatatcc gggagtcaga 960  
 cgatgagtga taagatccac cgctcgaagg ggaacagccc agaccaccaa ttaaggtccc 1020  
 taaatacatg ctgagtggaa aaggatgtgg agttgcatag acagctagga tgttggtc 1080  
 gaagcagcca ccatttaaag agtgcgtaat agtcactag ccgagtgatt ctgcgccgaa 1140  
 aatttaccgg ggctaagcat gttaccgaaa ttgtggattc gaccgtaagg tcgagtata 1200  
 ggagagcgtt ctaagggcaa cgaagcaaga tcgcaaggac ttgtggagcg cttagaagtg 1260  
 agaatgccgg tatgagtagc gaaagatcag tgagaatctg atccaccgaa tgactaaggt 1320  
 ttcctgggga aggctcgtcc tcccagggtt agtcgggacc taagccgagg ccgcaaggcg 1380  
 taggcgatgg ataacaggtt gatattcctg tactagttaa tcatgtttga acgatggagg 1440  
 gacgcaggag gctatggtgt gcacacgatt ggaaatgtgt gttcaagcgt caagtctggt 1500  
 gatgagtcaa atgcttatcg ctaaggacaa ggcgtgacga ggaccgaatt ttagtaggga 1560  
 agcgcagat gtcacactgc cgagaaaagc ttctagttag tgattaatta cccgtaccgc 1620  
 aaaccgacac aggtagtcca ggagagtatc ctaaggtgag cgagtgaact ctctgtaagg 1680  
 aactcggcaa aatgaccccg taacttcggg agaaggggtg ctgcacgcaa gtgcagccgc 1740  
 agtgaaaagg cccaggcgac tgtttatcaa aaacacaggt ttctgcaaaa tcgaaaagatg 1800  
 acgtataggg gctgacgcct gcccggtgct ggaaggttaa gtggatgagt tagcttcggc 1860  
 gaagcccaga aatgaagccc cagtaaaccg cgccgtaac tataaccgtc ctaaggttagc 1920

gaaattcctt gtcgggtaag ttccgacccg cacgaaaggc gtaacgatct gggcactgtc 1980  
 tcaacgagag actcggtaga attatattac ctgtgaagat gcaggttacc cgcgacagga 2040  
 cggaaagacc ccatggagct ttactgtagc ttgatattgg gtgttgacac agcttgtaga 2100  
 ggataggtcg gagccgtaga actcggaaac ctagtttcga gtgaggcgct ggtgggatac 2160  
 gaccctcgct gtgtgaacac tctaaccgc accacttatc gtggtgggag acagtgtcag 2220  
 gtaggcagtt tgactggggc ggtcgctcc taaaagtaa cggaggcgcc caaaggttct 2280  
 ctcaaatgg ttggaaatca ttcgtcagat gtaaaggcag aagagagctt gactgcgaga 2340  
 caggctcagc agggacgaaa gtcgggctta gtgatccggt ggtaccgtat ggaaggccca 2400  
 tcgctcaacg gataaaagct accctgggga taacaggctt atctcccca agagtccaca 2460  
 tcgacgggga gggttgacac ctgatgtcg gtcacgcga tcctggggct gtagtcggtc 2520  
 ccaagggttg ggctgttcgc ccattaaagc ggtacgcgag ctgggttcag aacgtcgtga 2580  
 gacagttcgg tccctatccg tcgcgggcgt aggaatttg agaggagctg tccttagtac 2640  
 gagaggaccg ggatggacat accgctggtg taccagttgt gccgccaggc gcatcgttg 2700  
 gtagctatgt atggatgaga taaacgtga aagcatctaa g 2741

<210> 83

<211> 2821

<212> DNA

<213> Lactobacillus spp. ABBC74

<400> 83

aacggccgcc agtgtgctgg aattcggctt ctaggagccg atgaaggacg ggactaacac 60  
 cgatatgctt cggggagctg tacgtaagct ttgatccgga gatttccgaa tggggaaacc 120  
 cagccatctt aaccgatggt tattgcttag tgaatacata gctaagtaaa ggacagctg 180  
 gggaactgaa acatctaagt acccacagga agagaaagca attgcgattc ccatagtagc 240  
 ggcgagcgaa gtgggagcag cccaaccag gaagcttgct tcctgggggt gtaggactga 300  
 acatttgagt taccaaagt gtgtgtagtt gaacaggttg ggaagcctgg ccaagaggg 360  
 tgatagcccc gtaaacgaaa ccaataaccc tcagttcagg atcctgagta cggccagaca 420  
 cgtgaaacct ggtcggaaac cgggaggacc atctcccaag gctaaatact ccctagtac 480  
 cgatagttaa ccagtaccgn gagggaaagg tgaagaagc cccggaaggg gtagtgaata 540  
 gttcctgaaa ccatgtgcct acaattaggt tggagcccg taatgggtga cagcgtgcct 600  
 tttgtagaat gaaccggcga gttacgctaa catgcaaggt taagttgaaa agacggagcc 660  
 gtagcgaaag cgagtctgaa acgggcgttt cagtatgttg gtgtagacc gaaaccaggt 720  
 gacctacca tgtccagggt gaaggtgcgg taaaacgcac tggaggcccg aaccgtgta 780  
 cgttgaaaag tgctgggatg aggtgtgggt agcgggtgaa ttccaaacga acttgagat 840  
 agctggttct ctccgaaata gctttagggc tagcctcgga attgagaatc gtggaggtag 900  
 agccactgtt tggactaggg gcccgatcag ggttactgaa ttcagataaa ctccgaatgc 960  
 cacagattta tatcgggag tcagacggtg agtgataaga tccatcgtc aaagggaac 1020  
 agccagacc accaattaag gtccctaagt gtatcctaag tggaaaaggc ggtgaagttg 1080  
 catagacagc taggatgttg gtcagaagc agccaccatt taaagagtgc gtaatagctc 1140  
 actagccgag tgattttcg ccgaaatgt accggggcta aggataccac cgaaattgtg 1200  
 gatgtgacca ttaggtcacg tgataggaga gcgttctaag ggcgggtgaag ctatgcgta 1260  
 aggactagt gagcgcttag aagtgagaat gccggtatga gtagcgaaag atcagtgaga 1320  
 atctgatcca ccgaatgact aaggtttcct ggggaaggct cgtcctcca gggttagtcg 1380  
 ggacctaaag tgaggccgag aggcgtaagc gatggctaac aggttgagat tcctgtacta 1440  
 gtaaagtgtg ttgaacgat ggagggacgc aggaggctaa gccgtgcga cgattggaaa 1500  
 tgtcggttca agcagtaagt caggttacca gttaaagtgt ggcagccggg ttgacaagct 1560  
 gtgatgagga ccgaatttaa gtagggaagt ggccgacgac acactgccga gaaaagcttc 1620  
 tagtgaatac ttattatccc gtaccgaaa ccgacacagg tagtcgagga gagtatccta 1680  
 aggtgtgca gtgaactctt gtaaggaaac tcggcaaat gacccgtaa ctccgggaga 1740  
 aggggtgtg cacgcaagt cagccgagc gaaaaggctc aggcgacctg ttatcaaaa 1800  
 acacaggtt ctgcaaatc gtaagatgac gtataggggc tgacgcctgc ccggtgctg 1860

aaggttaagt ggatgagtta gcttcggcga agcccagaaa tgaagcccca gtaaaccggcg 1920  
 gccgtaacta taacggctct aaggtagcga aattccttgt cgggtaagtt ccgacccgca 1980  
 cgaaggcgt aacgatctga gactgtctc aacaagagac tcggtgaaat tatagtacct 2040  
 gtgaagatgc aggttacccg cgacaggacg gaaagacccc atggagcttt actgtagctt 2100  
 gatattgggt gttgacacaa cttgtacagg ataggtcgga gccgtagagg ccggaacgct 2160  
 agtttcggca gaggcgctgg tgggatacga cccttggtgt gtgaacactc taaccgcac 2220  
 cacttagcgt ggtgggagac agtgtcaggt gggcagtttg actggggcgg tcgcctccta 2280  
 aaaagtaacg gaggcgccca aaggttccct cagaatggtt ggaatcatt cgtagagtgt 2340  
 aaaggcagaa gggaacttga ctgcgagaca gacaggtcga gcagggacga aagtcgggct 2400  
 tagtgatccg gtggtaccgt atgcaagggc catcgctcaa cggataaaag ctaccctggg 2460  
 gataacaggc ttatctcccc caagagtcca catcgacggg gaggtttggc acctcgatgt 2520  
 cggctcatcg catctgggg ctgtagtcgg tccaagggt tgggctgttc gccattaaa 2580  
 gcggtacgcg agctgggttc agaacgtcgt gagacagttc ggtccctatc cgtcgcgggc 2640  
 gtaggaaatt tgagaggagc tgttcctagt acgagaggac cggaatggac acaccgctgg 2700  
 tgtatcagtt gtgccgccag gcgcattgct gagtagctat gtgtggatga gataaacgct 2760  
 gaaagcatct aagtgtgaaa gccgaattct gcagatatcc atcacactgg cggccgctcg 2820  
 a 2821

<210> 84

<211> 2937

<212> DNA

<213> *Lactobacillus lindneri*

<400> 84

gaattcggct taagttaata aaggcgccac ggtgaatgcc ttggtactag gagccgatga 60  
 aggacggaac taacaccgat atgcttcggg gagctgtacg taagctttga tccggagatt 120  
 tccgaatgag gaaactcgac cagtgtcatg actggtcact gcgtagtga tacatagctg 180  
 cgagaggca gacgtgggga actgaaacat ctaagtaccc acaggaatat aaagaaattt 240  
 cgattcccaa agtagcggcg agcgaactgg gaatagccca aaccggacct ttatggtcgg 300  
 gggttgtagg actgaacatt tgagttacaa aagtatttga taattgaagc agctgggaag 360  
 ctgcacaaa gagagtata gtctcgtaa tgaaatcgaa tacctcagt tcaggatcct 420  
 gtagtcggcg ccacacgtgt aacggcgctg gaatccggga ggaccatctc ccaaggctaa 480  
 atactcccta gtgaccgata gtgaaccagt accgtggggg aaaggtagaa agcaccgccg 540  
 aaggggagtg aaatagttcc tgcaacatg tgcctacaag cagttagagc ccgttaacgg 600  
 gtgtagcgt gccttttga gaatgaaccg gcgagttaca gttgcatgca aggttaagcc 660  
 gaaaaagcgg agccgtagcg aaagcaagtc ttaagagggc gtttagtat gttgccgtag 720  
 acccgaaacc aggtgatcta tcatgtcca ggatgaaagt gcggtatac gcaccggagg 780  
 tccgaaccgg gtacgttga aaagtgtggt gatgaggtgt ggatagcggg gaaattccaa 840  
 acgaacttgg agatagctgg ttctctccga aatagcttta gggctagcct cggaattaga 900  
 atcgtggagg tagagccact gtttgagcaa ggggtccatc taggattact gagttcagat 960  
 aaactccgaa taccactgat ttatgtccgg gtagtcagac atgagtata agatccatcg 1020  
 tcgaaagggg aacagcccag accgccagtt aaggctccca aatatatgct aagtggaaaa 1080  
 ggtagtgaag ttgcatagac aactaggatg ttggctcaga agcagccatc atttaaagag 1140  
 tgcgtaatag ctactagtc gagtattct gcgccgaaa atttaccggg gctaagcata 1200  
 ttaccgagac tgcagacgca actacgttgc gtgtaggag agcgttctaa gggcaatgaa 1260  
 ggacagaccg aaggactgct ggagcgctta gaagttagaa tgccggtatg agtagcgaaa 1320  
 gatcagttag aatctggccc accgaatgac taaggtttcc tggggaaggc tcgtcctccc 1380  
 agggtttagt gggacctaag ccgaggctga gaagcgtagg cgatggataa caggttgaga 1440  
 ttctgtact agttaattat gtttgaacaa tggaggagc cagaaggcta agttatgcat 1500  
 actgatggaa atgtatgttc aaatcgtaag tcaggttatg agttaaatgc ttgtaacctg 1560  
 gttggcaagc gatgatgagg atcgaaattt aagtagagaa gtaacccatg tcacgctgcc 1620  
 gagaaaagct tctagttagt aattaattac ccgtaccgca aaccgacaca ggtagtcgag 1680

gagagtatcc tcagggtgagc gagagaactc tcgttaagga actcggcaaa atgaccccgt 1740  
 aacttcggaa gaaggggtgc tggcctcacg gccagccgca gtgaaaagac tcaaacgact 1800  
 gtttatcaaa aacacaggtt tatgcaaaat cgtaagatga agtatatggg ctgacgcctg 1860  
 cccgggtgctg gaaggttaag tggaaaggtt agcttcggca aagcctcgaa atgaagcccc 1920  
 agtaaacggc ggccgtaact ataacggtcc taaggtagcg aaattccttg tcgggtaagt 1980  
 tccgaccgcg acgaaaggcg taacgatttg agtactgtct caacgagaga ctcggtgaaa 2040  
 ttaagatacc tgtgaagaag cagggtaccc gcgacaggac ggaaagaccc catggagctt 2100  
 tactgtagct tgatattggg tgtttacata gcttgtacag gataggtagg agccatagaa 2160  
 gccggaacgc tagtttcggt ggaggcgtca gtgggatact acccttgcta tgtgaacact 2220  
 ctaaccctga gcacttaacg tgctcggaga cagtgtctgg ttggcagttt gactggggcg 2280  
 gtcgcctcct aaatagtaac ggaggcgtc aaaggtttgc ttagaatggt tggaaatcat 2340  
 ttgtaaagtg taaaggcaaa agcaagcttg acttgcgagc caaacaggtc gagcaggac 2400  
 gaaagtcgga cttagtgtac cggtgtgacc atatggaagg gccatcgctc aacggataaa 2460  
 agctaccctg gggataacag gcttatctcc cccaagagtt cacatcgacg gggagggttg 2520  
 gcacctcgat gtcggctcat cgcatcctgg ggctgtagtt ggtcccaagg gttgggctgt 2580  
 tcgcccatta aagcggtagc cgagctgggt tcagaacgctc gtgagacagt tcggtcccta 2640  
 tccgtcgcgg gcgagggaaa tttgagagga gctgtcccta gtacgagagg accgggatgg 2700  
 acataccgct ggtgtatcag ttgcgccgcc aggcgcattg ctgagtagct atgtatggat 2760  
 gagataaacg ctgaaagcat ctaagtgtga aactcgcctc aagatgagat ttcccattcc 2820  
 tatatggaag taagactcct gaaagatgat caggctcgata ggtagaagt ggaagcatag 2880  
 tgatatgtga agcggactaa tactaatagg tcgaggactt gacaaaaagc cgaattc 2937  
 <210> 85  
 <211> 2940  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus plantarum  
 <400> 85

gaattcggct taagttaata aaggcgccac ggtgaatgcc ttggcactag gagccgatga 60  
 aggacgggac taacaccgat atgcttcggg gagctgtacg taagctatga tccggagatt 120  
 tccgaatggg gcaaccagc agttttaatc aactgttacc actagatgaa ttcatagtct 180  
 agttggaggt aaacgctgtg aactgaaaca tctcattagc agcaggaata taaagaaatt 240  
 tcgattccct aagtagcggc gagcgaacgg ggaacagccc aaaccaaagt gcttgcactt 300  
 tggggttgta ggactgaaca tttgagttac caaagaactt gatagtcgaa ggatttggga 360  
 aaatccgcca tagatggtga tagcccagta gattaaatca aattctctca gttcaggatc 420  
 ctgagtacgg cggaacacgt gaaattccgt cggaatccgg gaggaccatc tccaaggct 480  
 aaatactacc tagtgaccga tagtgaacca gtaccgtgag ggaaagggtga aaagcacc 540  
 gggaggggag tgaatatgtt cctgaaacca tgtgcctaca ataagtcaga gcgcgttaat 600  
 gcgtgatggc gtgccttttg tagaatgaac cggcgagtta tgatcccggt caagggttaag 660  
 actaaaaagt cggagccgta gcgaaagcga gtctgaaatg ggcgttttga gtacgaggtt 720  
 atagaccgga aaccagggtga cctatccatg tccagggtga aggtgcggtg aaacgcactg 780  
 gaggaccgaa cccgtgtaag ttgaaaattg ctgggatgag gtgtggatag cggtgaaatt 840  
 ccaaacgaac ttggagatag ctggttctct ccgaaatagc tttagggtga gcctcggaat 900  
 taggatcatg gaggtagagc actatttga ctagggggccc gtcttgggtt actgaattca 960  
 gataaactcc gaatgccatt gattcatatc cgggagtcag acgatgagtg ataagatcca 1020  
 ccgtcgaaag gggaacagcc cagaccatca gttaagggtcc ctaaatgtat gctaagtgga 1080  
 aaaggatgtg gaggttgcata gacaactagg atgttggctc agaagcagcc accattttaa 1140  
 gagtgcgtaa tagctcacta gtcagtgat cctgcgccga aaatgtaccg gggctaagca 1200  
 tactaccgaa accatggatg cgaccattag gtcgcgtgat aggagagcgt tctaaggccg 1260  
 gtgaagcaag atcgtgagga cttgtgaagc gcttgaagt gagaatgccg gtatgagtag 1320  
 cgaaagatag gtgagaatcc tatccaccga atgactaagg tttcctgggg aaggctcgtc 1380  
 ctcccagggt tagtcgggac ctaagtcgag gccgagaggc gtagacgatg gataacaggt 1440

tgagattcct gtactagtta agtgcgtttg agcaatggag ggacgcagga ggctaagatg 1500  
 tgcatctctgt tggattagaa tgtccaagca gtaagtcttg tgaagagtca aatgcttttc 1560  
 actttaagga caagctgtga cggggagcga aatttagtag cgaagcgtct gatgtcacac 1620  
 tgccgagaaa agcttctagt gagtacttaa ctacccgtac cgcaaacga cacaggtagt 1680  
 cgaggagaga atcctaaggt gagcagtgga actctcgtta aggaactcgg caaatgacc 1740  
 ccgtaacttc gggagaaggg gtgctgatcg caagatcagc cgagtgat agggccaggc 1800  
 gactgtttat caaaaacaca ggtctctgca aaatcgcaag atgacgtata ggggctgacg 1860  
 cctgcccggt gctggaaggt taaaaggatg ggtagcttc ggcaagctc agaattgaag 1920  
 ccccgataaa cggcgccgt aactataacg gtcctaaggt agcgaattc cttgtcgggt 1980  
 aagttccgac ccgcacgaaa ggcgtaacga tctgggact gtctcaacga gagactcgg 2040  
 gaaattatat tgtccgtgaa gatgcggact acccgcgaca ggacggaaag accccatgga 2100  
 gctttactgt agcttgatat tgagtgtttg tacagcttgt acaggatagg taggagccat 2160  
 agaaaccgga acgctagttt cgggtggagc gttgggtgga tactaccctc gctgtatgac 2220  
 cactctaacc cgcaccacta atcgtggtgg gagacagtgt cagggtggca gtttgactgg 2280  
 ggcggtcgcc tcctaaaaag taacggagc gcccaaaggt tccctcagaa tggttgaaa 2340  
 tcattcgag agtgtaaagg cacaaggag cttgactgcg agacagacag gtcgagcagg 2400  
 gacgaaagtc gggcttagtg atccggtgt accgtatgga agggccatcg ctcaacggat 2460  
 aaaagctacc ctggggataa caggcttacc tcccccaaga gtccacatcg acgggaaggt 2520  
 ttggcacctc gatgtcggct catcgcatcc tggggctgta gtcggtccca agggttgggc 2580  
 tgttcgcca ttaaagcgg acgcgagctg gggtcagaac gtcgtgagac agttcggctc 2640  
 ctatccgtcg cggcgtagg aaatttgaga ggacctgtcc ttagtacgag aggaccggga 2700  
 tggacatacc tctggtgtac cagttgtgcc gccaggcgca tcgctgggta gctacgtatg 2760  
 gatgtgataa acgctgaaag catctaagt tgaaacacac ctcgagatgg gatttcccat 2820  
 tcctttatgg aagtaagacc cctgaaagat gatcaggtag ataggtaga agtggcagtg 2880  
 cggtgacgca tgaagcgac taataactaat aggtcgagga cttgaccaa agccgaattc 2940  
 <210> 86

<211> 2942

<212> DNA

<213> *Pediococcus damnosus*

<400> 86

gaattcggct taagttaata aaggcgcn c ggtgaatgcc ttgtactag gagccgatga 60  
 aggacgggac taacaccgat atgcttcggg gagctgtaag taagcttga tccggagatt 120  
 tccgaatggg gaaaccaac aacattaatc cgttgttacc gccacgtgaa tacataacgt 180  
 ggttggaggt agacgtggg aactgaaaca tctcagtacc cacaggaata gaaagaaaa 240  
 tcgattcccc gagtagcggc gagcgaagg ggaacagccc aaaccaggaa gcttgcttcc 300  
 tggggttgta ggaccgaaca tttgagttac caaagatttt catagccgaa cagtctggga 360  
 agactggcca gagcgggtga cagccccgta ggcaaatga aaatccctca gttcaggatc 420  
 ctgagtacgg cggaacacgt gtaactccgt cggaaatccg gaggaccatc tccaaggct 480  
 aaatactccc tagtgaccga tagtgaacca gtaccgtgag ggaaagggtga aaagcacc 540  
 gaaaggggag tgaacagtt cttgaaacca tgtgcctaca agaagtcaga gcccgtaat 600  
 gggtagtgcc gtgccttttg tagaatgaac cggcgagtta cgtttgcatg ccaggttaag 660  
 ttgaagaaac ggagccgtag cgaaagcgag tctgaatagg gcgactgagt atgcagatgt 720  
 agaccgaaa ccaagtgacc taccatgtc caggttgaag gtgcggtaaa acgactgga 780  
 ggaccgaact cgtgtacgtt gaaaagtgt gagatgaggt gtgggtagcg gtgaaattcc 840  
 aaacgaactt ggagatagct ggttctctcc gaaatagctt tagggctagc ctcggactta 900  
 ggatcatgga ggtagagcca ctgtttggac taggggcca tctagggtta ctgaattcag 960  
 ataaactccg aatgccattg atttatgtcc gggagtcaga cggtagtgta taagatccat 1020  
 cgtcgaaagg ggaacagccc agaccaccag ttaagggtccc taaatatatg ttaagtggaa 1080  
 aaggatgtgg agttgcatag acaactagga tgttggtca gaagcagcca tcatttaaag 1140  
 agtgcgtaat agctcactag tcgagtgtt ctgcgccgaa aatgtaccgg ggcttaaaca 1200



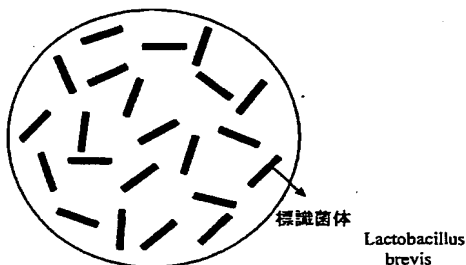
tattaccgag actgtggatg ccaccgtaag gtggcgtgat aggagagcgt tctaaggcg 1260  
 atgaaggcag accgtgagga ctgttgagc gcttagaagt gagaatgccg gtatgagtag 1320  
 cgaagacag gtgagaatcc tgtccaccga atgactaagg tttcctgggg aaggctcgtc 1380  
 caccagggt tagtcgggac ctaagtcgag gccgagaggc gtagacgatg gataacagg 1440  
 tgagattcct gtactagtta aacttgtttg aacaatggag ggacgcagga ggctaagaaa 1500  
 agcacacagt tggataagtg tgccaagca acaagtctta gatagagtta aatgctttat 1560  
 cttttcagga caagtgtga tggggagcga aatttaagta gcgaagtctc tgatgtcaca 1620  
 ctgccgagaa aagcttctag ttagagtta actaccgta ccgcaaaccg acacaggtag 1680  
 tcgaggagag tatcctcagg tgagcgagag aactctcgtt aaggaaattcg gcaaatgac 1740  
 cccgtaactt cggaagaagg ggtgctgac gcaagatcag ccgcagtga taggccagg 1800  
 cgactgttta tcaaaaacac aggtttctgc aaaatcgtaa gatgacgtat aggggctgac 1860  
 acctgcccg tgctggaagg ttaagtgaat gagttagctt cggcgaagct ttggaatgaa 1920  
 gccccagtaa acggcgccg taactataac ggtcctaagg tagcgaatt ccttgtcggg 1980  
 taagtccga cccgcacgaa aggtgtaacg atctgggcac tgtctcaacg agagactcgg 2040  
 tgaattata ataccgtga agatgcgggt taccgcgac aggacggaaa gacccatgg 2100  
 agctttactg tagcttgata ttgagtgtt gtacaacttg tacaggatag gtaggagccg 2160  
 tagacatga aacgctagtt tcgatggagg cggttggtggg atactacct cgttgtatga 2220  
 accctctaac ccgcgccact aagcgtggcg ggagacagtg tcaggtaggc agtttgactg 2280  
 gggcggtcgc ctctaaaga gtaacggagg cgccaaagg ttccctcaga atggttgag 2340  
 atcattcgca gagtgtaaag gcacaaggga gcttgactgc gagacagaca ggtcgagcag 2400  
 ggacgaaagt cgggcttagt gatccggtgg taccgtatgg aagggccatc gctcaacgga 2460  
 taaaagctac cctggggata acaggcttat ctcccccaag agttcacatc gacggggagg 2520  
 tttggcacct cgatgtcggc tcacgcacatc ctggggctgt agtcgggtccc aagggttggg 2580  
 ctgctcgccc attaaagcgg tacgcgagct gggttcagaa cgtcgtgaga cagttcggtc 2640  
 cctatccgtc gggggcgtag gaaatttgag aggatctgtc cttagtacga gaggaccggg 2700  
 atggacatac cgctggtgta ccagttgttc cgccaggagc atcgtgggt agctacgtat 2760  
 ggatgagata aacgctgaaa gcatctaagt gtgaaactca cctcgagatg agatttccca 2820  
 ttccatttat ggaagtaaga cccctgagag atgatcagg agataggttg ggagtgaag 2880  
 tgtagtgata catggagcgg accaatacta ataggtcgag gacttgacca aaagccgaat 2940  
 tc

## 【図面の簡単な説明】

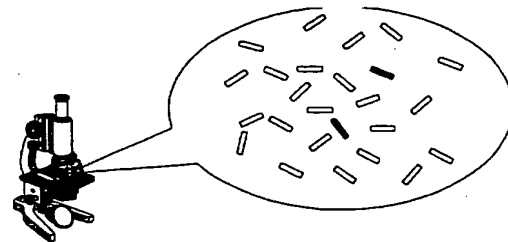
【図1】 FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法によるラクトバチルス プレビスの検出を示す図。

【図2】 蛍光顕微鏡観察によるラクトバチルス属及びペディオコッカス属の定量を示す図。

【図1】



【図2】



## フロントページの続き

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号   | F I      | テーマコード(参考)    |
|---------------------------|--------|----------|---------------|
| C 1 2 R                   | 1:25)  | (C 1 2 Q | 1/68 A        |
| (C 1 2 Q                  | 1/68   | C 1 2 R  | 1:225)        |
| C 1 2 R                   | 1:225) | (C 1 2 Q | 1/68 A        |
| (C 1 2 Q                  | 1/68   | C 1 2 R  | 1:01)         |
| C 1 2 R                   | 1:01)  | C 1 2 N  | 15/00 Z N A A |

(72)発明者 本山 靖朗  
茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ  
ヒビール株式会社酒類研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA05 AA11 CA01 CA09 CA11  
DA05 HA13  
4B063 QA01 QQ06 QQ42 QR08 QR56  
QR62 QS16 QS25 QS34 QS36  
QX02

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CA/REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*     | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| $\frac{X}{A}$ | Chenoll E. et al., Identification of Carnobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc and Pediococcus by rDNA-based techniques. Syst.Appl.Microbiol., 2003, Vol.26, No.4, pages 546 to 556 | $\frac{1}{2-11}$      |
| $\frac{X}{A}$ | JP 10-210980 A (Asahi Breweries, Ltd.), 11 August, 1998 (11.08.98), (Family: none)                                                                                                   | $\frac{1}{2-11}$      |
| $\frac{X}{A}$ | JP 2003-250557 A (Sapporo Breweries Ltd.), 09 September, 2003 (09.09.03), (Family: none)                                                                                             | $\frac{1}{2-11}$      |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 April, 2005 (26.04.05)

Date of mailing of the international search report  
17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002331

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*     | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <u>X</u><br>A | Munoz R. et al., Ser-127-to-Leu substitution in the DNA gyrase B subunit of Streptococcus pneumoniae is implicated in novobiocin resistance. J.Bacteriol., 1995, Vol.177, No.14, pages 4166 to 4170 | <u>1</u><br>2-11      |